

STIC-ILL

not owned

From: Schnizer, Holly
Sent: Monday, June 10, 2002 3:37 PM
To: STIC-ILL
Subject: ref. request for appl. no. 09/647,522

399094

I would like to request the following reference:

AN 1985: 142175 TOXCENTER
CP copyright 2002 ACS
DN CA10321175714H
TI Toxins of Carybdea rastonii
Au Sato, Akihiko
CS Res. Inst. Biol. Act., Tokyo Med. Dent. Univ., Tokyo Japan
SO Ochanomizu Igaku Zasshi, (1985) Vol. 33, No. 2, pp. 131-151

If you need any add'l info. or have any questions, you can reach me by email or the phone number below.

Thank you.

Holly Schnizer
AU 1653
CM1-9E09
305-3722
mailbox: CM1-9B01

as
6/10

L Number	Hits	Search Text	DB	Time stamp
1	1	(jelly adj fish) NEAR5 hemolytic	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:31
2	0	rastonii NEAR5 hemolytic	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:31
3	0	rastonii NEAR5 pesticide	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:32
4	1	hemolytic NEAR5 pesticide	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:32
5	13	treatment NEAR5 (jelly adj fish)	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:34
6	0	nagai-hiroshi.in. and rastonii	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:35
7	0	nagai-hiroshi.in. and (jelly ADJ fish)	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:35
8	626	nagai-hiroshi.in.	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:36
9	51	nakajima-terumi.in.	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:36
10	0	nakajima-terumi.in. AND (jelly ADJ fish)	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:36
11	1	nakajima-terumi.in. AND hemolytic	USPAT; US-PGPUB; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB; USOCR	2002/06/10 13:36

アンドンクラゲの毒成分の研究

佐藤 昭彦*

I 緒言

クラゲによる刺傷被害は、世界各地で発生し報告されている。オーストラリアの Great barrier reef では *Chironex fleckeri* により毎年多数の遊泳者が刺傷を受け、重症の場合死亡する例も出ている¹⁾。また、カツオノエボシ (*Physalia physalis*) による被害も多く、大西洋、太平洋、インド洋の熱帯から温帯水域で、非常に恐れられている²⁾。

わが国でもクラゲによる被害は、毎年多発している。日本沿岸で人に刺傷を起こすクラゲとしてはカツオノエボシ、キタカギノテクラゲ (*Gonionemus oshoro*)³⁾、アンドンクラゲ (*Carybdea rastonii*)、アカクラゲ (*Chrysaora quinquecirrha*)、ハブクラゲ (*Chiropsalmus quadrigatus*)⁴⁾、ヒクラゲ (*Tamoya gargantua*) などが知られている。刺傷の症状はクラゲの種類や、患者の個人差により程度が異なるが、その第一は、刺傷部位の疼痛、発赤、丘疹、小水泡、蕁麻疹様苔癬などの皮膚症状である。重症例では、出血斑、壊死を起こし、頭痛、発熱、吐気、呼吸困難、脈拍の変動などの全身症状を伴い死亡することもある。

毒成分としては、初期の研究で thalassin (tetramine 様作用) や congestin (serotonin 様作用) などの低分子物質が考えられたが、Lane⁵⁾ はカツオノエボシの触手から刺胞を単離して検討した結果、これらの低分子物質は刺胞以外の触手に由来するものと報告した。また Freeman ら⁶⁾ は *Chironex fleckeri* から snake milking 法と同様な方法で得た毒成分には、serotonin のような低分子物質が含まれていないことを示した。現在では、刺胞毒が、酸、アルカリ処理、加熱処理、有機溶媒処理、プロテアーゼ処理などで失活し、透析されない高分子物質であることから、その主体は、タンパク質であると考えられている^{5,7)}。これまでタンパク毒の精製が

試みられてきたが、非常に不安定で活性の消失が早いことや、試料の大量入手が困難なことから、完全に精製された例はなかった。

数種のクラゲに共通して、溶血、皮膚壊死、心臓毒性、致死などの生物活性が認められている^{5,8,9,10)}。最近、Tamkun ら¹¹⁾ は、カツオノエボシから、致死と溶血活性をもつ分子量24万の糖タンパク質を精製し、Physalitin と名づけた。また、Gaur ら^{12,13)} によりアカクラゲの致死因子に対するモノクローナル抗体が得られ、immunochromatography による精製が進められている。毒成分の精製は生物活性因子の性質を解明するために重要である。

わが国の太平洋沿岸、とくに関東地方の、湘南海岸や内房海岸で一番多いクラゲ被害は、アンドンクラゲによるものである。クラゲ刺傷件数は、江ノ島海岸だけで、昭和46年685件、昭和47年478件発生し、そのほとんどが通称“電気クラゲ”と呼ばれるアンドンクラゲによるものと推測されている¹⁴⁾。

このような被害の多さにもかかわらず、その毒成分についての研究は見当たらない。そこで、アンドンクラゲの毒成分を明らかにするとともに毒成分の薬理学的性質を解明するために本研究を行った。触手の凍結乾燥物から調製した粗抽出液中には、溶血、血小板凝集、肥満細胞脱顆粒、血管平滑筋収縮、皮膚壊死、心臓毒性および致死などの活性成分が存在し、このような、細胞レベルから組織および生体レベルにまで影響を及ぼす活性成分を、溶血現象を指標とし分離精製しその性質について検討した。その結果、粗抽出液と同種の生物活性を有する3種のタンパク質が得られた^{15,16)}。さらに、毒成分の作用機作を、血小板凝集¹⁷⁾ならびに血管平滑筋収縮作用について詳細に検討し、細胞膜の脱分極の結果もたらされた細胞内遊離カルシウム濃度の増加が、活性発現に際して重要な役割を演じていることを明らかにした。

II 材料および方法

1. アンドンクラゲの採集および同定

アンドンクラゲ (*Carybdea rastonii*, Haacke, 1886) (写真1) は、腔腸動物門鉢虫綱立方クラゲ目に属する

* 東京医科歯科大学医学部生理活性 (主任：中嶋暉躬教授)

昭和60年3月26日受付

本研究の一部は第56回日本生化学会大会、日本薬学会第104年会、日本薬理学会第71回関東部会および第58回日本薬理学会総会で発表を行った。



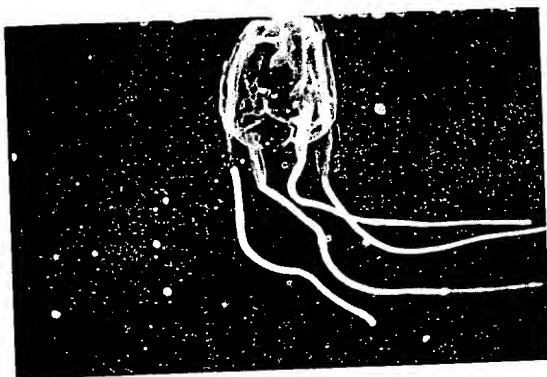


写真1 アンドンクラゲ

クラゲで、8、9月頃、北海道から九州までの太平洋および日本海沿岸に産し、早朝および夕方に出現する^{18,19)}。傘は立方形で、傘高30-50mm、傘幅25-30mmである。寒天質は薄い硬く無色透色である。触手は4本で間軸に生じ、茶褐色で長く、遊泳時には傘高の10倍にも伸長することがある²⁰⁾。触手には大形の紡錘形刺細胞が環状に規則的に配列され、刺激により刺糸が反転射出され、毒成分が注入される²¹⁾。刺細胞は一種類で、長軸約50 μ m、短軸約25 μ m、刺糸は約1.5mmにも達する(写真2)。

アンドンクラゲを、1981-84年の8月中旬から9月上旬にかけて、神奈川県三浦郡葉山町鑑裾の相模湾で午後6-8時に採集した。採集したクラゲの触手の部分を切断し、ドライアイスで凍結した後、凍結乾燥し、 -60°C で保存した。

アンドンクラゲの同定は、今島実博士(国立科学博物館動物学部門)に依頼し、確認された。

2. 溶血活性測定法

i ウサギ赤血球の調製

ウサギ(日本白色在来種)は、生後4カ月前後、体重2.0-2.5kgの雄を用いた。頸動脈からプラスチックカニューレにより全採血して、抗凝固剤として最終濃度0.38%のクエン酸ナトリウムを加えた。II-7-iの方法で血小板を除いた後の赤血球に、3倍容のリン酸生理食塩緩衝液(PBS)(mM: NaCl, 137; KCl, 2.7; Na_2HPO_4 , 8.1; KH_2PO_4 , 1.5; pH 7.4)を加え、1500 \times g、10分遠心して上清を除き洗浄した。この操作を3回繰り返した後、沈降した赤血球(RBC)を取り1%になるようにPBSで希釈した。

ii 定量的方法

被検液をPBSで希釈した溶液290 μ lに、1% RBC

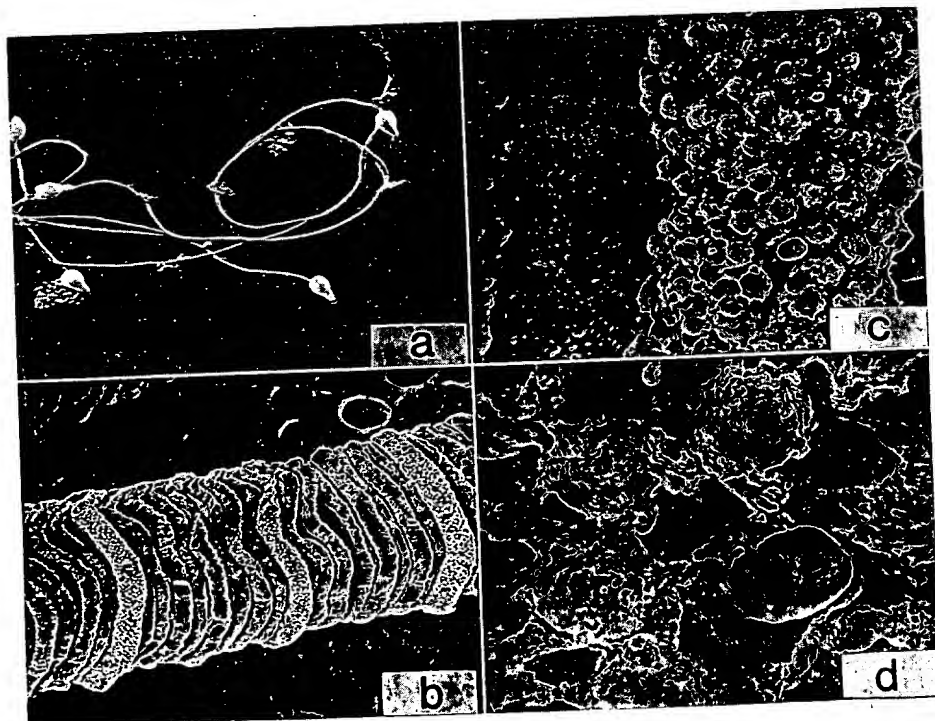


写真2 アンドンクラゲの触手および刺細胞
a, 発射した刺細胞(800倍)。b, c, d; 触手(100倍, 800倍, 4000倍)

10 μ l (1.5-2.0 $\times 10^6$ cell)を加えて、27.5°C、30分 incubate し、1500 \times g、5分にて遠心後の上清100 μ lを取り、flow-injection法で415nmのhemoglobinの吸収を測定した (pump; Toyosoda HLC 803-A, detector; Shimadzu SPD-1; flow rate; 2ml/min)。被検液無添加を0%, 超音波処理で完全に溶血させたものを100%とし、最終希釈率の対数値と溶血 percent を plot し、50%溶血する時の最終希釈率の逆数を unit/ml とした。

iii 半定量的方法

凝集反応用プレート (0.35ml/well, 96well)を用い、被検液をPBSで希釈した溶液100 μ lに1% RBC 100 μ lを加え、室温で30分 incubate し、100%溶血しているwellを肉眼的に判定した。活性は最終希釈率の対数値で表した。この半定量的方法はクロマトグラフィー後の分画の assay に用いた。

3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

陽イオン交換クロマトグラフィーは、CM-2 SW (Toyosoda; 4.6 \times 250mm)を用いて、Tri rotar III (Nihonbunkoh)で行った。

ゲルろ過クロマトグラフィーは、G-3000SW および G-2000SW (Toyosoda; 7.5 \times 600mm)を用いて、Tri rotar SR-2 (Nihonbunkoh)で行った。

4. 各種酵素活性の測定法

粗抽出液中の各種酵素活性は以下のように測定した。すなわち、trypsin および chymotrypsin は Hummel²²⁾の方法、Leu-aminopeptidase は Tuppy ら²³⁾の方法、esterase は Huggins ら²⁴⁾の方法、Alkaline-phosphatase は Garen ら²⁵⁾の方法、また phospholipase A₂ は Mollay ら²⁶⁾の方法に従ってそれぞれ測定した。

5. タンパク質量の測定

ウシ血清アルブミン (BSA) を標準タンパクとして用いて、Lowry ら²⁷⁾の方法で行なった。なお G-3000SW からの溶出液は、タンパク質量が微量であるため、一部分を塩酸加水分解した後、アミノ酸分析をして定量した。Tryptophan は 4% thioglycolic acid を加えた塩酸加水分解により定量した。アミノ酸分析は、Hitachi-655 形反応液体クロマトグラムを用いて、o-phthalaldehyde (OPA) 蛍光分析法で行った。

6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

12.5% polyacrylamide gel を用いて、Laemmli²⁸⁾の方法に従って行った。電気泳動終了後、0.1% coomassie brilliant blue R-250, 50% methanol, 15% acetic acid で固定染色した。タンパク質量が微量の場合には、Merril ら²⁹⁾の方法により、銀染色を行った。また、糖タ

ンパク質染色は Eckhardt ら³⁰⁾の方法で行った。

7. ウサギ血小板を用いた実験

i. ウサギ血小板の調製

II-2-i で得た血液を、室温で90 \times g、15分遠心を行い、上層を platelet-rich plasma (PRP) とした。下層をさらに1000 \times g、15分遠心してその上層を platelet-poor plasma (PPP) とした。

Washed platelet (WP) は、PRP を 50% BSA 上で1000 \times g、10分遠心して上清を除き、HEPES 緩衝液 (mM: NaCl, 145; KCl, 5; MgSO₄, 1; Na₂HPO₄, 0.5; Glucose, 5; HEPES, 10; pH 7.55) を等量加えて洗浄する操作を3回繰り返して調製した。

Gel filtrated platelet (GFP) は、Tangen ら³¹⁾の方法に従い sepharose 2B クロマトグラフィーにより調製した。

Low Na⁺ 溶液は HEPES 緩衝液の NaCl を 72.5mM にし、choline chloride 72.5mM を添加して調製した。

ii. 血小板凝集活性の測定

PRP 中の血小板数は Coulter counter (model Z-B Coulter electronics inc.) を用いて測定し、PPP を用いて血小板数が3.0-4.5 $\times 10^5$ cell/mm³ 範囲に入るように調整した。凝集実験は Born³²⁾の方法に従い、dual sample aggregation meter (Sienco; DP-247E) を用いて、37°C、攪拌下で行った。透過度を PRP により0%, PPP により100%に設定した。PRP 297 μ l に被検液 3 μ l を加えて透過度の変化を経時的に記録した。

iii. 血小板内遊離 Ca²⁺ 濃度の測定

血小板細胞内の遊離 Ca²⁺ 濃度は Rink ら³³⁾の方法に従って、膜透過性の Ca²⁺ 蛍光指示薬 quin-2/AM を用いて測定した。すなわち、WP (3.0-4.0 $\times 10^5$ cell/1.5ml) に quin-2/AM の濃度が15 μ M/10⁵WP になるように添加し、さらに1mM CaCl₂ または2mM EDTA、および被検液15 μ lを加えて、30°C、30分 incubate した後、励起波長339nm、測定波長492nm で蛍光を測定した (Hitachi; MPF-3)。2mM EDTA および1mM CaCl₂ のみ添加したものをそれぞれ50 μ M digitonin 処理した後、に蛍光強度を測定し、それぞれ F_{min} および F_{max} とした。細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) は、測定値 F から Tsien ら³⁴⁾の方法に従って次式により求めた。

$$[Ca^{2+}]_i (nM) = 115 \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

iv. 血小板膜電位の測定

血小板膜電位は蛍光指示薬 DiS を用い、Friendhoff ら³⁵⁾の方法に従って測定した。すなわち、GFP (5.5 $\times 10^4$ cell/mm³) 1.5ml に0.5mM DiS 6 μ l、被検液15 μ l を

添加して、37°C、5分 incubate した後、励起波長 620 nm、測定波長 670 nm で蛍光を測定した。DiS を添加した時の値と、さらに 2 μ M valinomycin を添加した時の値の差を 100 unit とした。1 unit は 0.951 mV に相当する。

v. ^{22}Na の流入の測定

Feinberg ら^{36,37)}の方法に従って、 ^{22}Na の流入を測定した。WP (3.0-4.0 $\times 10^5$ cell/ml) 1ml に、0.5 μ Ci- $^{22}\text{NaCl}$, 0.2 μ Ci- ^{125}I human serum albumin, 被検液 10 μ l を加え、silicon oil (SH 550: SH 200=4:1, Toray silicone) 0.3ml の上で、37°C にて一定時間 incubate した後、12000 \times g にて 1 分遠心することによって血小板のみを silicon oil 層下に沈降せしめた。上清の一定量 (5 μ l) を分取した後、silicon oil を除き、血小板に soluen-350 (Packard) 125 μ l を加えて 60°C、6 時間処理して溶解し、冷却後、isopropanol 375 μ l を加えた。先の上清 5 μ l も同様に処理し、両者の ^{22}Na および ^{125}I の放射活性をガンマカウンター (Packard 800-C) で測定した。沈殿した血小板に捕捉された緩衝液量は、沈殿と上清の ^{125}I の比からもとめた。血小板中の ^{22}Na 量は、沈殿中の ^{22}Na 量と捕捉された緩衝液中の ^{22}Na 量との差から求められ、上清 1 μ l 中の ^{22}Na 量との比から求めた "space" で表わし、10⁵個血小板に換算し、 μ l/10⁵ platelets で示した。

8. ウサギ血管平滑筋を用いた実験

i. ウサギ血管平滑筋標本の作製

II-2-i で放血したウサギから胸部大動脈を摘出し、95%O₂, 5%CO₂ 飽和の Krebs-Henseleit 溶液 (KH 溶液) (mM: NaCl, 118.4; KCl, 4.7; MgSO₄·7H₂O, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; glucose, 11.1; CaCl₂ 2H₂O, 2.5) 中で、ラセン状に切開して、3 \times 25mm の短冊状標本を作製した。

ii. 血管平滑筋収縮の測定

20ml 容 (CrTX-I, II, III 用には、2ml) の Magnus 二重管を用いて、血管平滑筋標本を 37°C、KH 溶液中に 2g の張力を負荷して懸垂し、等尺性収縮を記録した (Nihon kohden; FD transducer SB-1T)。標本懸垂後、60分平衡化した後、被検液を添加した。薬物処理は 30分間行つた。

Ca²⁺ 除去栄養液 (Ca²⁺free) (KH 溶液から CaCl₂ 2H₂O のみ除去) および低 Na⁺ 栄養液 (Low Na⁺) (KH 溶液の 60ml NaCl を同濃度の choline chloride にて置換) 処理はそれぞれ 60 分および 30 分行つた。血管平滑筋に用いる溶液は、いずれも 95%O₂, 5%CO₂ で飽和し

た。

iii. ^{45}Ca の流入の測定

^{45}Ca の流入および流出は Godfraind ら³³⁾の方法に従って測定した。血管平滑筋標本の湿重量を測定した後、生理的食塩水 (PS 溶液) (mM: NaCl, 112; KCl, 5; MgSO₄·7H₂O, 1.2; NaHCO₃, 25; Glucose, 11.5; CaCl₂·2H₂O, 1.25) 中に 2g の張力を負荷して懸垂し、60分平衡化した。1 μ Ci/ml $^{45}\text{CaCl}_2$ を加え、5 分後に被検液を添加し一定時間 incubate した後、100%O₂ 飽和の La³⁺ 溶液 (mM: NaCl, 122; KCl, 5.9; MgCl₂, 1.25; Glucose, 11; LaCl₃, 50; Tris-maleate, pH 6.8, 15) で 5 分処理して組織表面の Ca を La で置換した³⁹⁾。標本を vial に移し、soluen-350 を 1ml 加え、60°C 1 時間で溶解し、冷却後 aquasol-2 (NEN) を 4ml 加えて、 ^{45}Ca の放射活性を液体シンチレーションカウンター (LSC) (Packard 460-C) で測定した。組織内に取り込まれた ^{45}Ca 量は次の式から求めた。

$$^{45}\text{Ca} \text{ (m mol/kg wet wt.)} = (\text{dpm in muscle}) / (\text{m mol Ca/l medium}) / (\text{kg wet wt.}) \text{ (dpm/l medium)}$$

iv. ^{45}Ca の流出の測定

血管平滑筋を II-8-iii と同様に平衡化した後、1 μ Ci/ml $^{45}\text{CaCl}_2$ を添加して 2 時間、 ^{45}Ca を取り込ませた。PS 溶液に変えて 5 分後に被検液を添加し各時間 incubate した。II-8-iii と同様に処理し、組織内に残存する ^{45}Ca を測定した。

v. ^3H -norepinephrine efflux の測定

Sakakibara ら⁴⁰⁾の方法に従い行つた。血管平滑筋標本は湿重量を測定した後、100 μ g/ml ascorbic acid, 10⁻⁵M corticosterone-21-acetate, 3 $\times 10^{-7}$ M ^3H -norepinephrine (^3H -NE; 3.55 μ Ci) を含む KH 溶液 1ml 中で、37°C、90分 incubate した。incubation 終了後、標本を表面灌流用装置に装着し 100mg/l の ascorbic acid を含む KH 溶液で表面灌流 (1ml/min) し、90分平衡化した。平衡後、被検液を含む KH 溶液にて表面灌流した。平衡化の終わる 10 分前から灌流液を集め (1ml/vial), instagel (Packard) 6ml を加えて ^3H の放射活性を LSC (Packard 460-C) で測定した。その際生ずる張力変化についても同様に記録した。放出された ^3H -NE 量は、cpm/mg wet wt. で表わした。

9. その他の生物活性測定法

i. 肥満細胞からの脱顆粒および histamine 放出の測定

Wistar 系雄性ラットを用いて、Amellal ら⁴¹⁾の方法に従い肥満細胞を調製した。肥満細胞 (2.5 $\times 10^5$ cell/ml)

20 μ l に試料20 μ l を添加し、37°C、30分 incubate した後、位相差顕微鏡を用いて鏡検した。Histamine は Yoshida ら⁴²⁾の方法により測定した。

ii. 皮膚壊死実験法

体重250-300g の Hartley 系雄性モルモットを用いて、Keen ら⁴³⁾の方法に従って行った。

iii. 心臓毒性実験法

Wistar 系雄性ラットを用いて、常法に従い心臓を摘出し、Langendorff 法による摘出心臓灌流実験を行った。灌流液は、95%O₂、5% CO₂ を飽和した Tyrode's 溶液 (mM: NaCl, 137; KCl, 2.7; NaHCO₃, 11.9; NaH₂PO₄·2H₂O, 0.4; Glucose, 5.6; CaCl₂·2H₂O, 1.8) を用い、30°C、8ml/min で灌流し、収縮力、心拍数、圧変化を記録した。(Nihon kohden; SB-1T, RP 5: Century technology; CP-01) 被検液は心臓近傍の流路に注入した。

iv. 致死活性実験法

dd 系雄性マウス (20-25g) に体重の1/200容量の被検液を尾静脈内投与し、投与直後より2時間にわたって行動の変化および死亡の有無を観察した。LD₅₀ は、Up and Down 法 (30分) により算出した。最少致死量は投与24時間後の死亡の有無から求めた。

死亡したマウスの肺、心臓ならびに脳を摘出し、10%ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋し5 μ m で薄切し、hematoxylin-eosin 染色 (H-E 染色) を施し鏡検して病理組織観察を行った。

10 電子顕微鏡観察

アンドンクラゲの触手、および毒成分により形成された血小板凝集塊を2% glutaraldehyde で、固定し、アルコール系列で脱水し、乾燥後 spatter coater で金を蒸着させ走査型電子顕微鏡 (COMTEC; CSM-501) で観察した。

11. 試薬

Arachidonic acid (Sigma). A-23187 (Sigma). collagen (Horm). ⁴⁵CaCl₂ (Amersham; 20 m Ci/mg). chlorphenylamine maleate (Kongo). diltiazem hydrochloride (Tanabe). DiS; 3-3'-dipropyl-2,2'-thiadicarbocyanine iodide (Nippon kankoh shikiso kenkyusho). 6-hydroxydopamine hydrochloride (Sigma). indomethacin (Merck Banyu). ¹²⁵I-human serum albumin (Midorijuuji; 0.036 m Ci/mg). ²²NaCl (NEN; 282.41 m Ci/mg). DL-7-³H(N) -norepinephrine hydrochloride (NEN; 58.82 m Ci/mg). phentolamine mesylate (Takeda). quinacrine (Sigma). quin-2/AM;

2{(2-amino-5-methylphenoxy) methyl}-6-methoxy-8-aminoquinoline-N, N, N', N',-tetraacetic acid tetra (acetoxymethyl) ester (Wako). tetrodotoxin (Sigma). valinomycin (Sigma). verapamil hydrochloride (Shiratori). その他の試薬は、特級もしくは生化学用をもちいた。

III 結果および考察

1. 抽出および精製

i. 粗抽出液中の生物活性と安定性

触手凍結乾燥物0.1g に1ml の生理的食塩水を加え、4°C、15分超音波処理 (45KHz) した後、1500 \times g、10分遠心した上清中の各種生物活性を示したのが表1である。粗抽出液中には、溶血、血小板凝集、肥満細胞脱顆粒、血管平滑筋収縮、皮膚壊死、心臓毒性および致死などを示す活性成分が含まれた。このような細胞から組織、生体レベルにまで影響を及ぼす活性成分を、活性検定法として溶血現象を指標とし、毒成分の安定性を検討するとともに精製を行った。

図1に、溶血活性の pH および温度安定性を示した。pH 4.0以下または pH 9.0以上で完全に失活し、pH 5.0-7.5では比較的安定であった。60°C 以上の熱処理でも急速に失活した。また、凍結融解、凍結乾燥、減圧乾固などの操作でも活性は50%以下に低下した。さらに粗抽出液を trypsin, chymotrypsin 処理した結果が表2である。Trypsin 処理5時間、chymotrypsin 処理1時間により溶血活性はそれぞれ約70%および90%低下した。これらの結果から、溶血活性を毒成分の主体は不安定なタンパク質と推定された。

粗抽出液中の各種酵素活性 (unit/mg protein) は、trypsin, 9.3 $\times 10^{-3}$; chymotrypsin, 8.5 $\times 10^{-2}$; Leu-aminopeptidase, 7.1 $\times 10^{-3}$; esterase, 2.5 $\times 10^{-3}$; Alkaline phosphatase, 2.2 $\times 10^{-3}$; phospholipase A₂, 5 $\times 10^{-4}$; といずれも低かった。粗抽出液の有する溶血作用が、混在する phospholipase A₂ に起因するのではないことが示された。また、毒成分の活性低下が混在する酵素作用によるものではないと考えられた。

ii. 精製

図2に精製過程をまとめた。凍結乾燥した触手5g に10倍容の50mM 酢酸ナトリウム pH 6.0 緩衝液を加え、4°C、15分超音波処理 (42KHz) をした。4°C、6000 \times g、30分遠心した後上清を集め、沈殿は再び抽出操作を繰り返して上清を合わせた。この上清に対して硫酸塩析を行った予備実験の結果が、図3である。溶血活性は40-60

表1 粗抽出液中の各種生物活性

Biological Activities	Dry Tentacle Weight (mg;protein)
Hemolysis	0.4×10^4 unit/mg (3.6×10^4 unit/mg)
Platelets Aggregation	10^{-6} g/ml (10^{-7} g/ml)
Mast Cell Degranulation	10^{-5} g/ml (10^{-6} g/ml)
Vasoconstriction	10^{-5} g/ml (10^{-6} g/ml)
Dermonecrosis	0.1 μ g/site (10 ng/site)
Cardiac Toxicity	50 μ g (5 μ g)
Lethal Activity	625 μ g/kg (62.5 μ g/kg) (M.L.D)*

* Minimum Lethal Dose

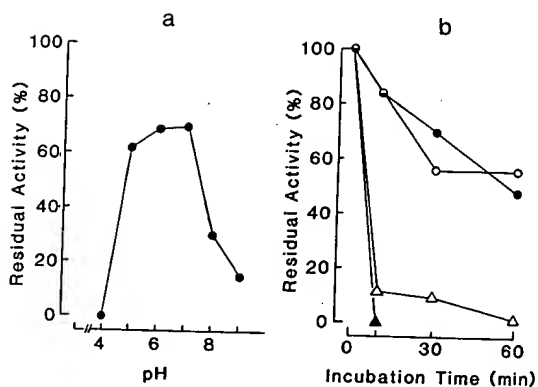


図1 粗抽出液中の溶血活性成分の安定性
タンパク質量はいずれも、 10^{-4} g/ml
a: pH 安定性。Michaelis緩衝液中、
室温で4時間処理
b: 温度安定性。40°C(○), 50°C(●),
60°C(△), 70°C(▲)

表2 粗抽出液中の溶血活性成分に対する
trypsin, chymotrypsin 処理の影響

Enzyme	Residual Activity (%)	
	Incubation Time (37°C)	
	1 hr	5 hr
Trypsin	160	33
Chymotrypsin	9.4	0

Enzyme concentration ; 0.1mg/ml .
Sample concentration ; 10^{-4} g/ml .

%硫酸沈殿に約90%回収された。そこで上清を硫酸塩析して、0-40%硫酸沈殿を6000×g, 30分遠心して除いた後、40-60%硫酸沈殿を同様に遠心して集め、上記緩衝液に溶解し、Diaflo YM-2 (分画分子量1000) (Amicon) を用いて限外ろ過して脱塩濃縮を行った。この部分精製

- Step 1. Sonication.
Lyophilized tentacle + 50mM CH_3COONa , pH6.0(A)
Sonicate; 45kHz, 15min, 4C
Centrifuge 6000xg, 30min.
- Step 2. 0-40%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation.
30min, 4C.
Centrifuge 6000xg, 30min. ppt. discard.
- Step 3. 40-60%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation.
60min, 4C.
Centrifuge 6000xg, 30min. sup. discard.
ppt. + Buffer, A
Desalt & concentration. Diaflo. YM-2.
(pCrTX)
- Step 4. HPLC, CM-2SW.
Buffer, A + 20% methanol
0.1-0.8M NaCl, linear gradient.
Concentration. Centricon-10.
- Step 5. HPLC, G-3000SW.
0.5M NaCl + 20% methanol
Constant flow.
Desalt & concentration. Centricon-10.
(CrTX-I, II, III)

図2 精製過程

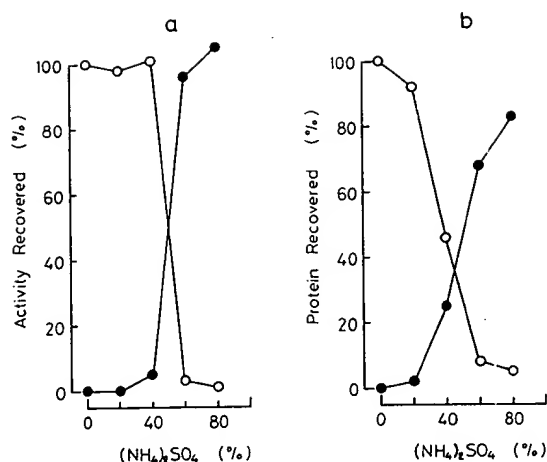


図3 硫酸塩析による溶血活性収率 (a) およびタンパク質収率 (b)
上清 (○), 沈殿 (●)

画分 (以後, partially purified *Carybdea rastonii* Toxin; pCrTX と呼ぶ) は比較的安定 (活性半減期約 2 週間) であるので薬理学的性質の検索に用いた。

pCrTX をさらに HPLC を用いて精製した。図 4 は CM-2SW を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行った結果である。溶血活性は食塩濃度 0.35M, 0.45M, 0.55M, の 3 カ所に溶離して得られたので, 溶出順に I, II, III と呼んだ。それぞれを分取した後, Centricon-10 (分画分子量 10000) (Amicon) を用いて濃縮した。図 5

は I, II, III それぞれを G-3000SW を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果である。得られた活性画分をそれぞれ, CrTX-I, CrTX-II, CrTX-III と呼んだ。

表 3 に精製の結果をまとめた。CrTX-I は約 170 倍, CrTX-II は約 250 倍, CrTX-III は約 80 倍精製された。CrTX-I, II, III を合わせた活性収率は約 4% であった。pCrTX からの比活性の上昇は, CrTX-I は約 80 倍, CrTX-II は約 120 倍, CrTX-III は約 40 倍であった。

iii CrTX-I, II, III の性質と関連性

CrTX-I, II, III の見かけの分子量を G-2000SW を用いて測定したところ (図 6), CrTX-I は 30.2 分, CrTX-II は 29.9 分, CrTX-III は 29.8 分にほぼ単一 peak として溶出し, それぞれ分子量 49000, 51000, 52000 であった。

CrTX-I, II, III について SDS ゲル電気泳動を行ったところ (図 7), CrTX-I および CrTX-III は 1 バンド, CrTX-II は 3 バンドを示した。分子量は, CrTX-I は 49000, CrTX-II は 100000, 51000, 49000, CrTX-III は 51000 であった。2-mercaptoethanol 存在下でも泳動位置に変動がなかった。また dansyl hydrazine を用いた糖タンパク質染色では発色しなかった (0.8% 以下)。したがって, CrTX-I, II, III は S-S 結合を含まず, また, 糖を含有しないことが示された。

精製された CrTX-II について再び CM-2SW 陽イオン交換クロマトグラフィーを行った結果, CrTX-II から

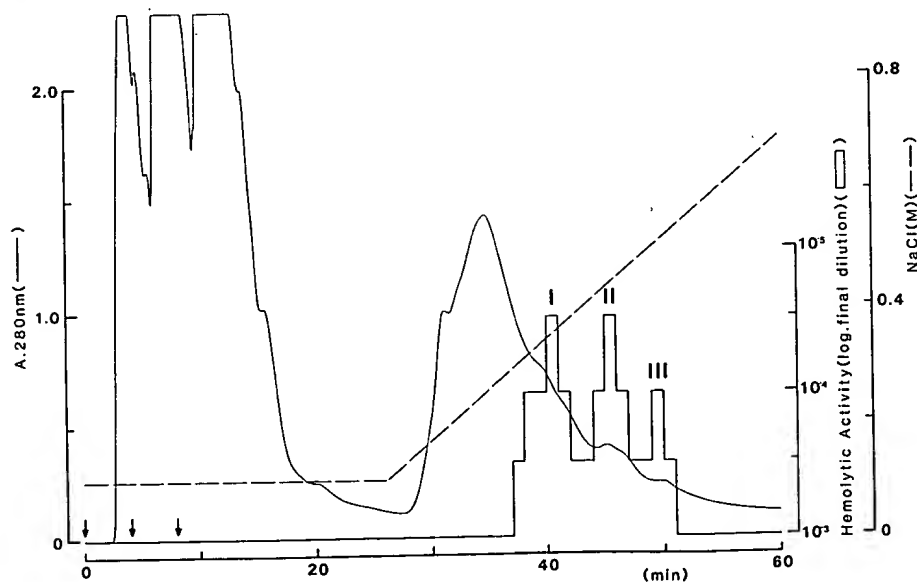


図4 CM-2SW 陽イオン交換 HPLC

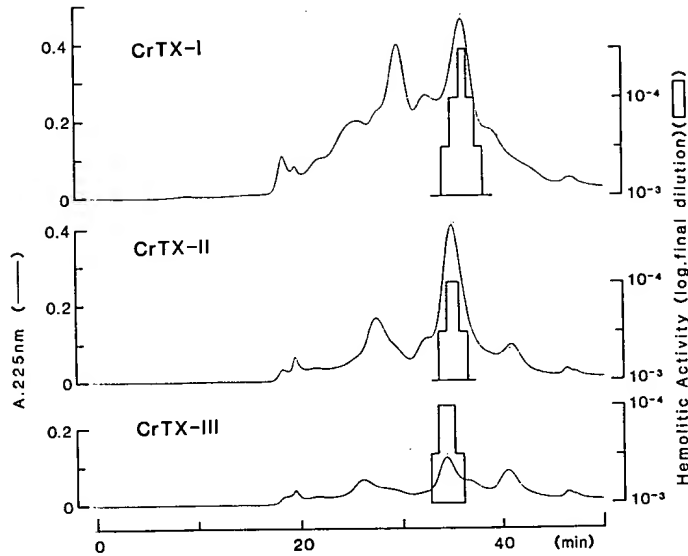


図5 G-3000SW ゲルろ過 HPLC

表3 精製表

	volume (ml)	total units ($\times 10^4$)	total protein (mg)	specific activity ($\times 10^4$ units/ mg)	purifi- cation	yield (%)
Homogenate	130	1625	455	3.57	1	100
0-40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	140	1489.4	203	7.34	2.1	91.7
40-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	30	1428.6	187.5	7.62	2.1	87.9
pCrTX	3.6	428.6	55.8	7.68	2.2	26.4
CM-2SW I	0.09	56.3	0.561	100.36	28.1	3.5
II	0.09	75.0	0.205	365.85	102.5	4.6
III	0.09	15.0	0.104	144.23	40.4	0.9
G-3000SW CrTX-I	0.135	28.1	0.047	597.87	167.5	1.7
CrTX-II	0.135	32.9	0.037	889.19	249.1	2.0
CrTX-III	0.135	2.3	0.008	287.50	80.5	0.1

IIa および IIb が得られた (図8)。IIa および IIb について SDS ゲル電気泳動を行ったところ、それぞれ CrTX-I および CrTX-III と一致した。

CrTX-I, II, III および IIa, IIb をアミノ酸分析した結果が表4である。いずれも cystin を含まず、類似のアミノ酸組成を示した。IIa, IIb のアミノ酸組成はそれぞれ CrTX-I, CrTX-III にほぼ一致した。また、CrTX-II (M.W. 100000 とした場合) のアミノ酸残基数は、CrTX-I と CrTX-III の合計にほぼ等しかった。

これらの結果から、CrTX-II は CrTX-I と CrTX-III の会合体であることが推測された。G-2000SW では、溶

離液の塩濃度が高いために会合体は形成されず、SDS 存在下など疎水的環境下で会合体が形成されると推測された。

CrTX-I, II, III の pH および温度安定性を溶血活性について調べた (図9)。pH 4.0 以下、pH 8.0 以上で失活したが、40°C の熱処理で CrTX-I, II は活性化されたが、50°C 以上ではいずれも急速に失活した。4°C, pH 6.0, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での活性の半減時間は、CrTX-I は約4時間、CrTX-II は約8時間、CrTX-III は約12時間であった。このように CrTX-I, II, III は非常に不安定であるため、薬理学的性質の検索はおもに pCrTX を用

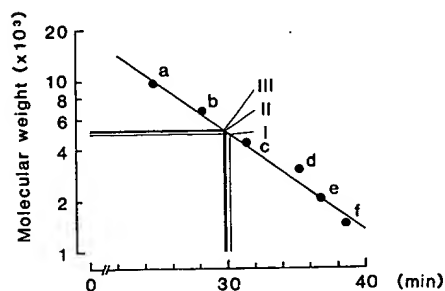
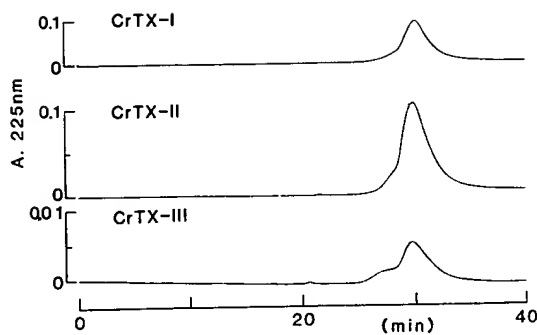


図6 G-2000XW による見かけの分子量測定
a: phosphorylase-b 94000, b: bovine serum albumin 67000, c: ovalbumin 43000, d: carbonic anhydrase 30000, e: trypsin inhibitor 20100, f: α -lactalbumin 14400

いて行い、一部の実験においては CrTX-I, II, III についてもその性質を調べた。

iv. pCrTX および CrTX-I, II, III の生物活性

表5に pCrTX および CrTX-I, II, III の各種生物活性を示した。pCrTX および CrTX-I, II, III はいずれも、粗抽出液が有する生物活性を示した。各種生物活性に対する pCrTX と CrTX-I, II, III の活性比は、精

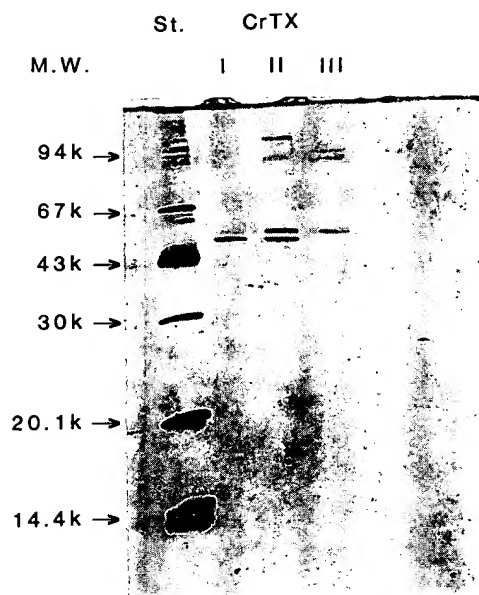


図7 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
T=12.5%, CrTX-I, II, III はいずれも 0.2 μ g, standard は図6と同じ。銀染色を行った。

製倍率にほぼ等しかった。

pCrTX および CrTX-I, II, III は肥満細胞に対して濃度依存性の脱顆粒作用を示した。このとき同時に histamine も放出された。

pCrTX および CrTX-II の皮膚に対する作用は、血管透過性亢進作用を伴い、浮腫、浸潤および壊死を起こした。

心臓に対して pCrTX および CrTX-II は、心拍数と収縮力を一過性に増加させた後、ともに減少させた。心

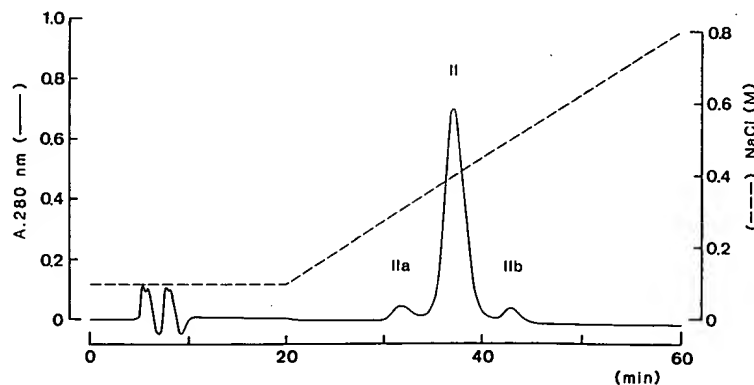


図8 CrTX-II の CM-2SW による再クロマトグラフィー

表4 アミノ酸組成

Amino Acids	CrTX-I	CrTX-II	CrTX-III	IIa	IIb
Asp	46.89	104.89	49.56	45.56	54.70
Thr	22.74	43.61	22.32	22.74	24.18
Ser	32.26	65.65	39.91	40.21	40.38
Glu	48.01	91.59	40.16	47.57	42.03
Pro	21.62	39.93	16.30	23.83	18.70
Gly	36.02	76.29	45.20	51.21	45.67
Ala	35.92	72.45	44.78	37.23	42.42
Cys	-	-	-	-	-
Val	24.51	52.85	28.78	25.85	27.84
Met	11.83	22.01	11.43	10.95	13.26
Ile	23.32	45.19	27.34	23.77	26.40
Leu	32.23	62.48	35.07	30.91	36.02
Tyr	15.60	30.72	17.03	11.70	15.19
Phe	16.42	32.62	15.72	15.09	16.20
His	9.55	21.03	10.95	10.46	11.90
Trp	6.92	15.77	8.68	6.92	8.22
Lys	32.47	69.84	28.49	34.66	29.44
Arg	23.07	49.36	24.07	23.07	25.92

(Amino acids / mole)

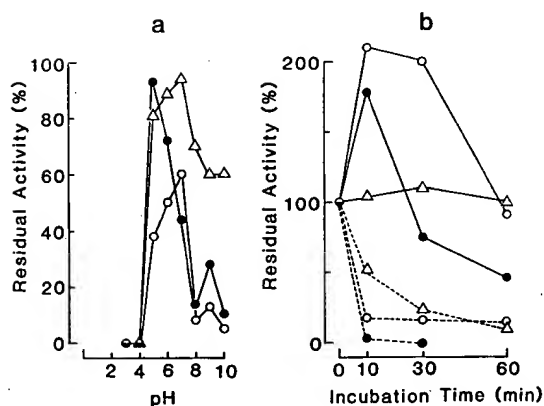


図9 CrTX-I (○), II (●), III (Δ) の溶血活性の安定性

a: pH 安定性。Michaelis 緩衝液中, 室温で2時間処理

b: 温度安定性。(—): 40°C, (---): 50°C

臓は収縮位で停止した。

マウスに pCrTX および CrTX-I, II, III を致死量投与すると, 運動失調, 後肢脱力, 呼吸困難, チアノーゼ, 排尿を示し, 激しい痙攣の後, 死亡した。直後に解剖すると, 肺の全域にわたって出血斑が認められたが心臓は活動しており, 他の臓器も正常であった。

pCrTX 投与後死亡したマウスの, 心臓, 肺および脳

を摘出しホルマリン固定後に病理組織検査を行ったところ, 脳には著変は認められず, 心臓では数例の心房心室内に弱好酸性細網状物質が認められた。また, 肺においては, 肺静脈内に弱好酸性細網状物質が多く認められ, 静脈内腔がこの構造物によつてふさがれていた(写真3, 矢印)。また肺静脈系血管周囲の疎性結合組織内には, 水腫および出血が認められた。これらの事実から, pCrTX 投与によるマウスの致死作用には肺静脈内に生じた細網状構造物による肺循環障害に起因する呼吸困難が少なくとも一部関与することが推測された。

2. ウサギ血小板に対する作用

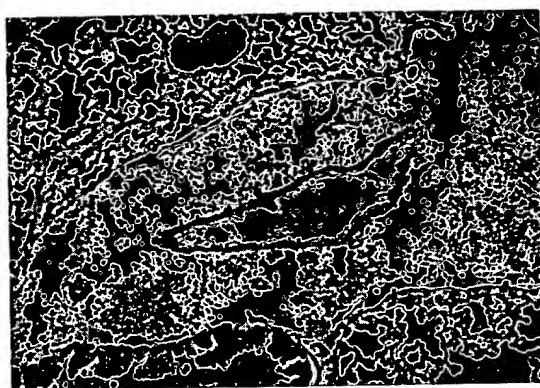
アンドクラーゲの触手粗抽出液から得られた pCrTX および CrTX-I, II, III は, ウサギ血小板において濃度依存性の凝集活性を示した(図10)。pCrTX の凝集活性は, 凝集誘発物質である collagen より約10倍高く, CrTX-I, II, III の凝集活性は pCrTX よりさらに約100倍高い値を示した。pCrTX および collagen 誘発凝集について走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ, 両者ともに多数の偽足を有する血小板の凝集塊が認められた。

pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発凝集は, collagen および arachidonic acid 誘発凝集を明らかに抑制する濃度の quinacrine および indomethacin によつてほとんど影響されなかつた。Quinacrine および indomethacin はそれぞれ phospholipase A₂ および cyclo-

表5 pCrTX, CrTX-I, II, III の各種生物活性

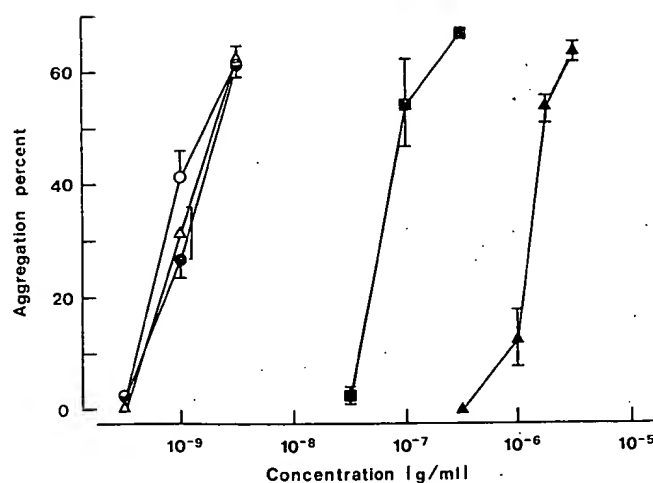
Biological Activities	pCrTX	CrTX-I	CrTX-II	CrTX-III
Hemolysis (unit/mg)	7.7×10^4	597.9×10^4	889.2×10^4	287.5×10^4
Platelets Aggregation (g/ml)	10^{-7}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}
Mast Cell Degranulation (g/ml)	10^{-6}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}
Vasoconstriction (g/ml)	10^{-6}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}
Dermonecrosis (ng/site)	5	N.D.*	0.05	N.D.
Cardiac Toxicity (μ g)	1	N.D.	0.1	N.D.
Lethal Activity (μ g/kg)	127.2(LD ₅₀)**	3.5(M.L.D.)***	3.6(M.L.D.)	3.0(M.L.D.)

* Not Determined, ** Median Lethal Dose, *** Minimum Lethal Dose

写真3 pCrTX 投与マウスの肺の病理組織観察
矢印；肺静脈内腔が弱好酸性細網状構造物によりふさがれている。血管周囲の疎性結合組織内には水腫および出血が認められる(HE染色, 100倍)

oxygenase の阻害剤として一般によく知られている。したがって pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発の血小板凝集は, arachidonic acid の遊離ならびに, その代謝物を介して惹起されるのではなく, collagen や arachidonic acid とは凝集発現機序を異にするものと思われる。

一般に形態変化, 凝集ならびに放出などの血小板機能の変化を誘発するには細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の増加が重要な役割を演じていると考えられている⁴⁴⁾。そこで pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発の血小板凝集機構を解明するために, Ca^{2+} との関連性について検討した。pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発凝集反応は 1 mM Ca^{2+} の添加によって明らかに増強された。これにたいして VPM は抑制作用を示した (図11-a, b)。次に, quin-2/AM を用いて細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度を測定した。pCrTX (図12-a) および CrTX-I, II, III (図12-b) の添加により細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度は濃度依存的に増加し, この増加は凝集活性と同じ作用濃度で発

図10 collagen (▲), pCrTX (■),
CrTX-I (○), II (●), III (△)
誘発の, 濃度-凝集曲線

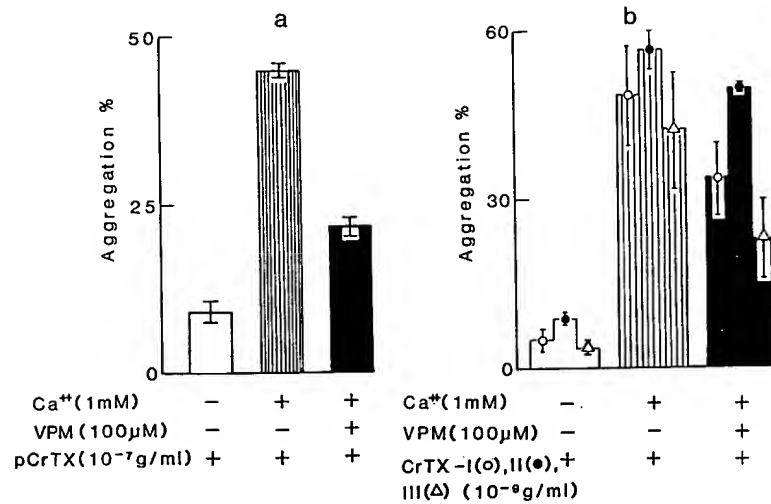


図 11 pCrTX (a), CrTX-I, II, III (b) 誘発凝集におよぼす Ca²⁺ および verapamil の影響

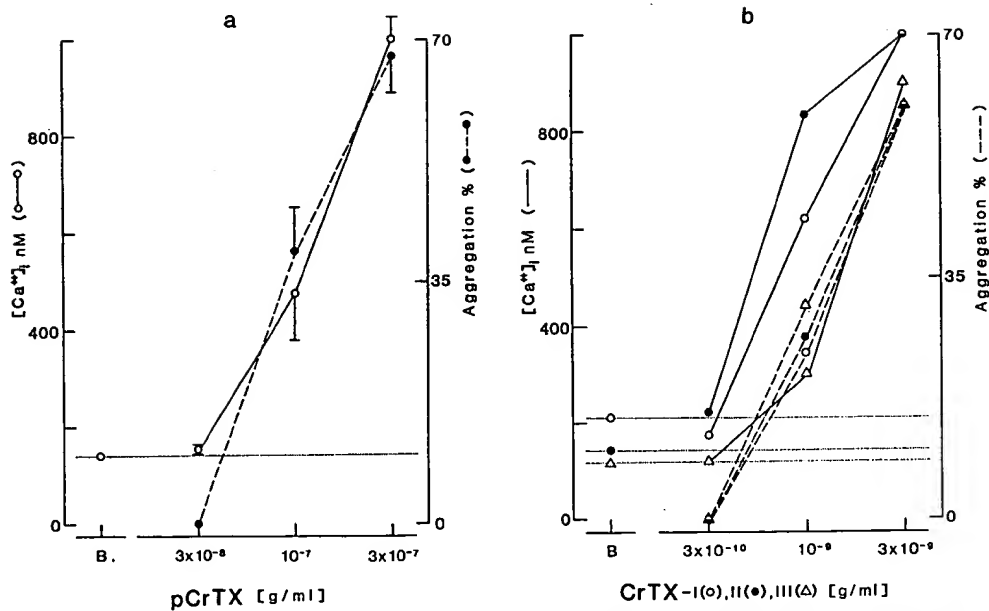


図 12 pCrTX (a), CrTX-I, II, III (b) 誘発の細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度の増加および凝集曲線

現していた。また、CrTX-I, II, IIIによる細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度の増加は VPM によって抑制傾向を示した (図13)。

以上の事実から、pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発の血小板凝集は、細胞外 Ca²⁺ 濃度に依存し、また細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度の増加の結果惹起されること、さらに細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度の増加には、少なくとも一部、電位依存性 Ca²⁺ チャンネルの関与することが推測さ

れた。

これらの推測は以下の事実によつて一部支持されるものと思われる。すなわち、DiS を用いて血小板膜電位を測定したところ、図14に示すように pCrTX 添加後、凝集活性の発現とともに持続的な脱分極が生じた。pCrTX および CrTX-I, II, III はいずれも濃度依存性の脱分極を惹起し、凝集反応の発現濃度と一致していた (図15-a, b)。

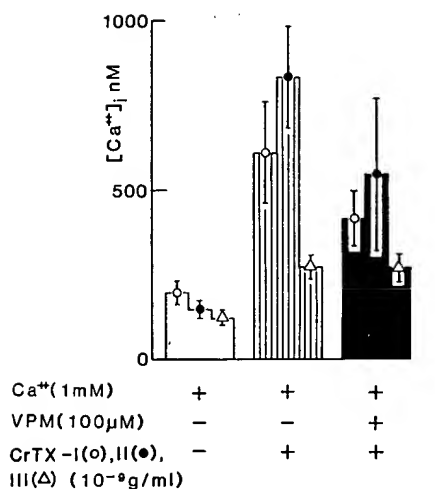


図 13 CrTX-I, II, III 誘発の細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度の増加におよぼす verapamil の影響

さらに、細胞外 Na⁺ の流入について、²²NaCl を用いて測定したところ (図16)、pCrTX 添加後2分ですでに細胞内 Na⁺ 量は約2倍に上昇しその後、時間の経過とともに上昇を続け、10分後には約4倍となった。pCrTX 誘発の脱分極は、Na⁺ チャンネル阻害剤である tetrodotoxin (TTX), procaine, および K⁺ チャンネル阻害剤である 4-aminopyridine (4-AP), tetraethylammonium (TEA) のいずれによっても約10%しか阻害作用

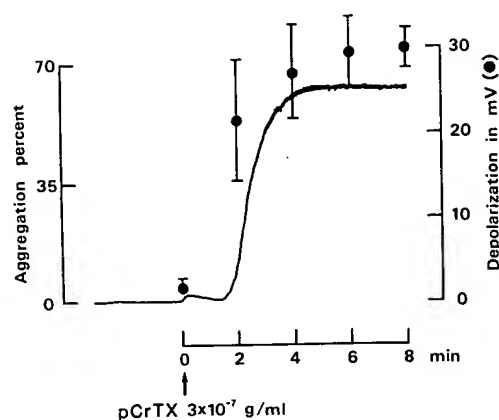


図 14 pCrTX誘発の凝集および脱分極の時間経過

を受けなかった (表6)。

一方、表7に示すように、pCrTX 誘発凝集、細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度の増加ならびに脱分極はいずれも低Na⁺ 栄養液中では著明に抑制 (約70-80%) されたが、Ca²⁺ 除去栄養液中での、pCrTX 誘発凝集は約80%と著明な抑制が認められたものの、脱分極に対する抑制は軽度 (約17%) にすぎなかった。

以上の結果から、pCrTX 誘発の血小板凝集は、TTX および procaine 抵抗性の経路を介した細胞外 Na⁺ の流入ならびに恐らくは4-AP, TEA 抵抗性の経路を介し

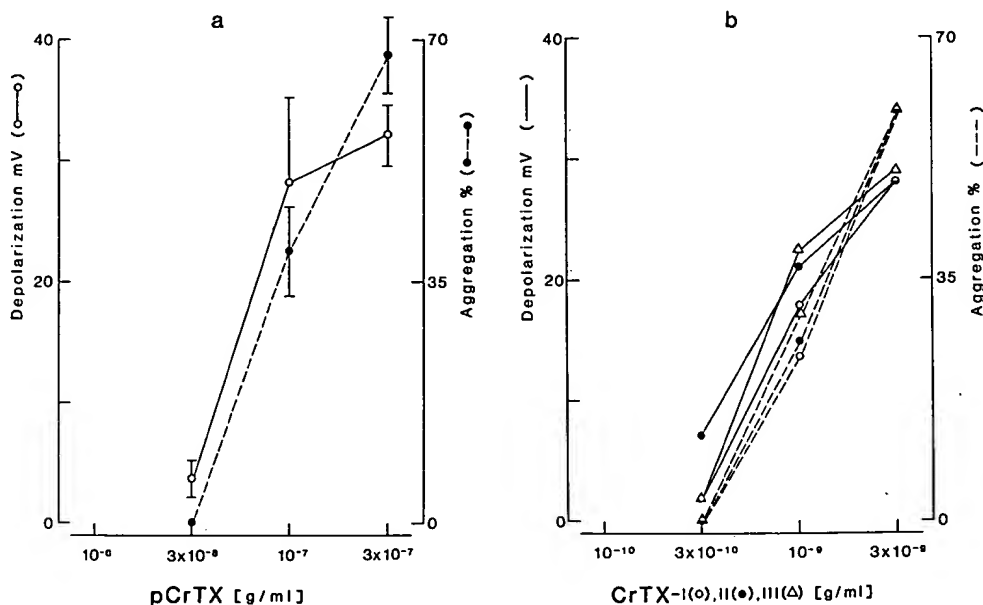


図 15 pCrTX (a) CrTX-I, II, III (b) 誘発の脱分極および凝集曲線

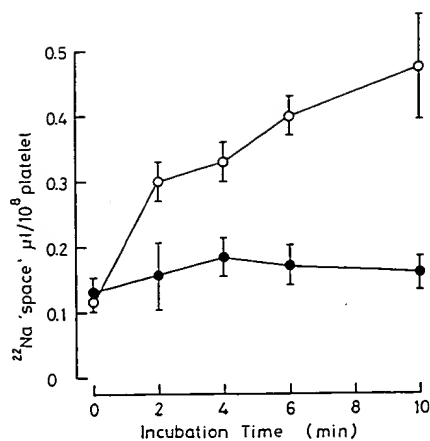


図 16 pCrTX による ^{22}Na の流入
(●): control, (○): pCrTX 3×10^{-7} g/ml

た K^+ の流出によつて持続的な血小板膜の脱分極が生じ、その結果、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の増加を来すために惹起されるものと考えられる。また、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の増加には、一部、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの関与することが考えられる。CrTX-I, II, III誘発の凝集反応も、pCrTX と同様な機序を介して惹起されることが推測され、従つて pCrTX の血小板凝集活性発

表 6 pCrTX による脱分極におよぼす薬物の影響

Drugs	Percent of decrease.
TTX (10^{-7} M)	10.0±5.4
Procaine (5×10^{-5} M)	10.0±3.2
4-AP (3×10^{-4} M)	11.2±6.1
TEA (10^{-2} M)	15.6±6.5

(pCrTX: 3×10^{-7} g/ml)

現に際して CrTX-I, II, IIIが主要な役割を担うのであろうと思われる。

3. ウサギ血管平滑筋に対する作用

pCrTX および CrTX-I, II, IIIはウサギ胸部大動脈ラセン状標本において、濃度依存性の収縮活性を示し(図17), いずれの場合にも濃度の増加につれて作用発現時間は短縮した。また、CrTX-I, II, IIIの収縮活性は pCrTX より約100倍高かった。図18に示すように、 Ca^{2+} 除去栄養液中 (Ca^{2+} free) において pCrTX を添加しても収縮はみられず、2.5mM Ca^{2+} の添加により直後から明らかな収縮が惹起された。CrTX-I, II, III, NE および KCl 誘発の収縮反応は Ca^{2+} free によつて程度に差はあるものの、いずれも抑制され、 Ca^{2+} の添加に

表 7 pCrTX 誘発の血小板凝集、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の増加および脱分極におよぼす Low Na^+ , Ca^{2+} free の影響

	Percent of decrease .		
	Aggregation	(Ca^{2+}) _i	Depolarization
Low Na^+	70.5±12.7	77.8±2.5	81.8±11.7
Ca^{2+} free	79.7± 2.1	-	17.4± 3.9

(pCrTX; 10^{-7} g/ml)

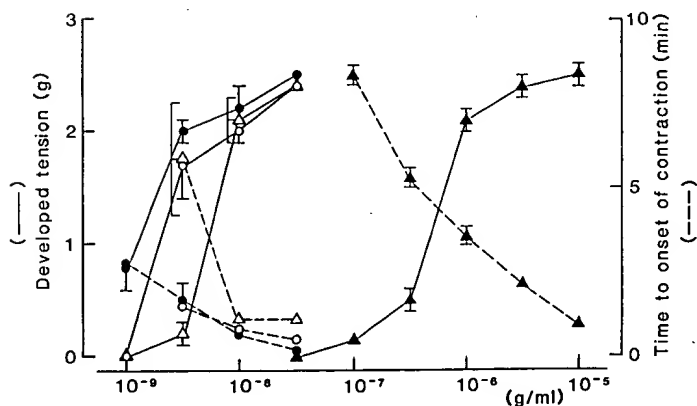


図 17 pCrTX (▲), CrTX-I (○), II (●), III (△) 誘発の濃度、収縮および作用発現時間曲線

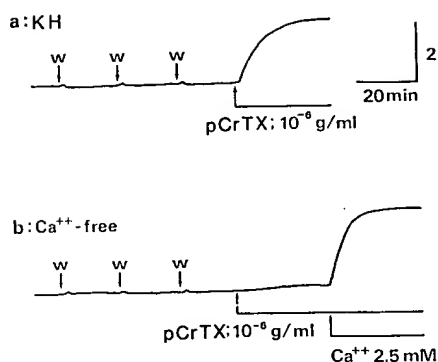


図 18 pCrTX 誘発の収縮反応と組織外 Ca^{++} の影響

より回復した (表 8)。さらに KCl 誘発の収縮反応をほぼ完全に抑制する濃度の verapamil (VPM) の前処置によって pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発収縮は約 50% 抑制されたが, NE 誘発収縮に対する抑制は軽度であった。以上のことから pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発の収縮反応は組織外 Ca^{++} 濃度に依存し, 一部, 電位依存性 Ca^{++} チャネルを介した Ca^{++} 流入の関与することが推測された。

そこで, $^{45}\text{CaCl}_2$ を用いて Ca^{++} の流入および流出について検討した (図 19)。 $^{45}\text{Ca}^{++}$ の流入において, pCrTX, NE および KCl の添加後, 5 および 15 分では組織内 $^{45}\text{Ca}^{++}$ 濃度は対照群のそれに比し高い値を示した。

が, 30 分では差がなかった (図 19-a)。一方, 図 19-b に示すように $^{45}\text{Ca}^{++}$ 流出に対して pCrTX, NE および KCl は, いずれも影響しなかった。pCrTX および CrTX-I, II, III は, いずれも添加後 15 分において $^{45}\text{Ca}^{++}$ の流入を明らかに増加したが, この増加は $100\mu\text{M}$ VPM によって抑制された (図 20)。NE および KCl についても同様の結果が得られた。

以上の事実は, 先の推測すなわち pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発の収縮反応は, 一部, 電位依存性 Ca^{++} チャネルを介する組織外 Ca^{++} の流入によってもたらされることをさらに裏付けるものと思われる。しかしながら, pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発の収縮反応は Ca^{++} free によって著明に抑制されるものの, 比較的高濃度の VPM 前処置によって約 50% 抑制されるにすぎず, 他の収縮発現機序の関与することが推測されたので, さらに以下の検討を行った。

一般に, 血管平滑筋は, 交感神経支配の密な組織の一つであることがよく知られている。そこでアドレナリン作動性 α 受容体遮断薬である phentolamine の影響について検討したところ, pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発の収縮反応はいずれも有意に抑制された (表 8)。したがって pCrTX および CrTX-I, II, III 誘発の収縮反応には, 神経終末からの NE の放出作用, または α 受容体の直接的な刺激作用の関与することが推測された。

表 8 pCrTX, NE, KCl, CrTX-I, II, III 誘発の血管平滑筋収縮反応におよぼす様々な処理の影響

	pCrTX (10^{-6}g/ml)	NE (10^{-6}M)	KCl ($3 \times 10^{-2}\text{M}$)	CrTX-I (10^{-8}g/ml)	CrTX-II (10^{-8}g/ml)	CrTX-III (10^{-8}g/ml)
Control	2.1±0.1	3.8±0.1	3.5±0.2	2.0±0.1	2.2±0.2	2.1±0.2
Ca^{++} free	0*	1.4±0.6*	0.5±0.1*	0.7±0.2*	1.1±0.4*	0.8±0.1*
2.5mM Ca^{++} add	2.2±0.4	3.9±0.1	3.5±0.1	1.7±0.3	1.9±0.1	2.0±0.2
Verapamil 10^{-6}M	1.0±0.1*	3.4±0.1*	0.2±0.0*	1.1±0.2*	1.4±0.1*	1.5±0.2*
Diltiazem 10^{-6}M	1.0±0.2*	-	-	-	-	-
Phentolamine 10^{-6}M	1.4±0.2*	1.1±0.1*	3.3±0.3	1.2±0.4*	1.4±0.2*	1.5±0.2*
6OHDA 10^{-4}M	1.2±0.2*	3.8±0.1	3.4±0.2	-	-	-
Guanethidine 10^{-5}M	2.5±0.2*	4.3±0.2*	3.5±0.2	-	-	-
Bretylium 10^{-5}M	2.1±0.2	-	-	-	-	-
Reserpinization	2.5±0.1*	4.4±0.1*	4.1±0.2*	-	-	-
Phentolamine+Verapamil	0.2±0.0*	-	-	-	-	-
6OHDA+Verapamil	0.3±0.0*	-	-	-	-	-
Tetrodotoxin $3 \times 10^{-6}\text{M}$	2.1±0.2	3.9±0.6	3.6±0.2	-	-	-
Low Na^{+}	1.3±0.1*	3.7±0.2	2.7±0.3*	-	-	-
Chlorphenylamine 10^{-5}M	2.0±0.1	-	-	-	-	-
Indomethacin 10^{-5}M	1.9±0.1	-	-	-	-	-

Results are given as mean developed tension (g)±S.E.

* $p < 0.01$

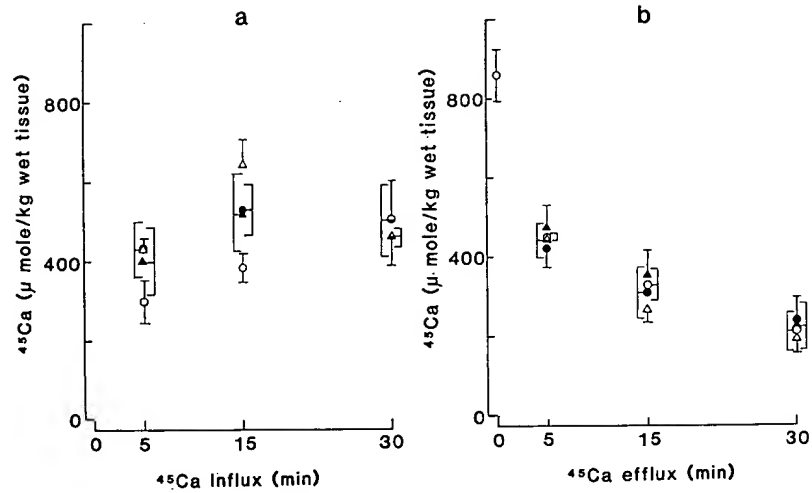


図 19 $^{45}\text{Ca}^{+}$ の流入 (a) と流出 (b)
(○) : control, (●) : pCrTX, (▲) : NE, (△) : KCl

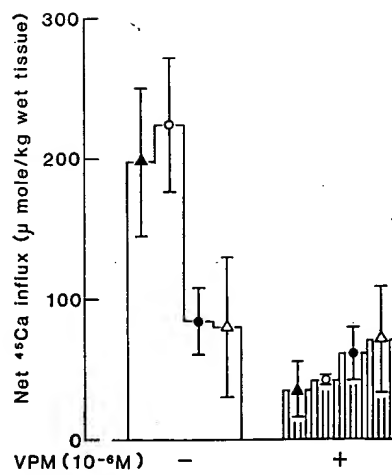


図 20 pCrTX (▲), CrTX-I (○), II (●), III (△) による $^{45}\text{Ca}^{+}$ の流入
におよぼす verapamil の影響
 $^{45}\text{Ca}^{+}$ incubation time: 15min

6-hydroxydopamine (6-OHDA) による除神経後の標本に pCrTX を添加しても軽度の収縮が惹起されるにすぎず、残った収縮反応は phentolamine では影響されず、VPM によつてほぼ完全に抑制された (表 8)。また, reserpine 処置したウサギの血管平滑筋では, 図 21-a に示すように pCrTX の添加により著明な収縮反応が惹起され, 正常ウサギより得た血管における反応 (図 21-b) より明らかに収縮の程度は大きかった。Reserpine 処置標本での収縮反応は VPM 前処置で約 90% 抑制さ

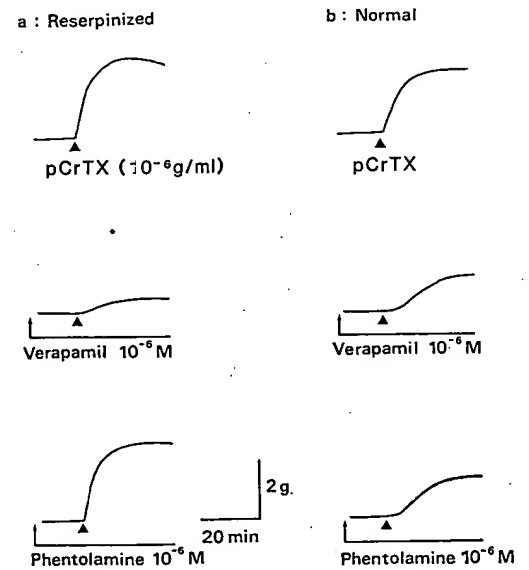


図 21 Reserpine 処置標本 (a) および正常標本 (b) における pCrTX 誘発収縮と verapamil, phentolamine の影響

れたが, phentolamine では影響されなかった。

以上の事実から, pCrTX はアドレナリン作動性の α 受容体に対する直接的な刺激作用の結果, 血管の収縮反応をもたらすものではなく, 壁内在交感神経終末部から NE を遊離することによるのであろうことが推測された。そこで, あらかじめ ^3H -NE を取り込ませた血管平滑筋に pCrTX を作用させたところ, 収縮反応発現に先立つて

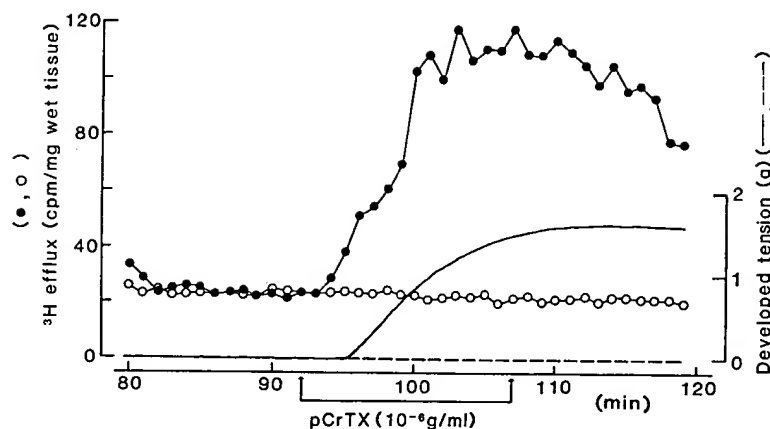


図 22 ^3H -NE を取り込ませた標本における pCrTX 誘発収縮と ^3H の放出, および Ca^{2+} free の影響
(●) (—): pCrTX, (○) (---): Ca^{2+} free

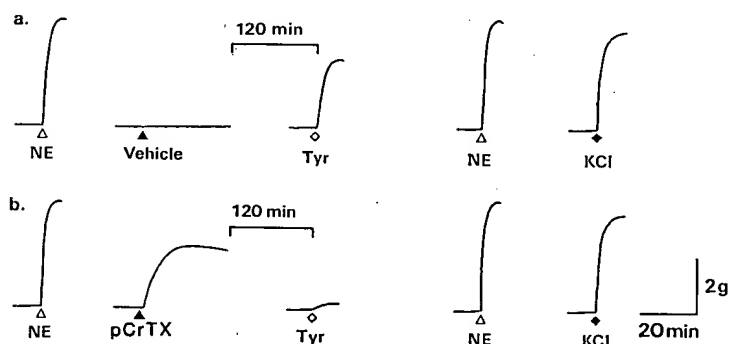


図 23 正常標本 (a) および pCrTX 処置標本 (b) における tyramine, norepinephrine, KCl 誘発の収縮反応
NE: 10^{-6}M norepinephrine, pCrTX: 10^{-6}g/ml , Tyr: 10^{-4}M tyramine, KCl: 30mM

持続的で著明な ^3H の放出が見られた (図22)。収縮反応ならびに ^3H 放出はいずれも Ca^{2+} free 下では完全に抑制され, また ^3H 放出は 6-OHDA により完全に抑制された。

したがって, pCrTX は交感神経終末部ならびに平滑筋の両者に作用点を有し, 前者に作用する結果, 終末部から NE を遊離し, また, 平滑筋に対しては一部, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを刺激して, それぞれ収縮の惹起に関与するものと考えられる。そして, pCrTX の両作用はともに細胞外 Ca^{2+} に依存することが示唆される。Hudgings ら⁴³⁾は, reserpine 処置後の血管平滑筋の Ca^{2+} 透過性は亢進しており, このことが化学伝達物質である NE のみならず, KCl などの収縮誘発物質に対しても超過敏性を示す理由であろうと報告している。

pCrTX 誘発収縮が reserpine 処置後に著明に増大していたのは, pCrTX の有する Ca^{2+} 依存性の平滑筋自体に対する作用が reserpine 処置によって増強された結果であろうと解釈することができる。

一方, pCrTX 誘発収縮は, 経壁電気刺激によって惹起される収縮を明らかに抑制する濃度の guanethidine や bretylium などの交感神経遮断薬によって抑制されず, guanethidine では増強がみられた (表8)。さらに, TTX も CAT 誘発収縮に対して影響しなかった (表8), pCrTX の NE 遊離機序は経壁電気刺激による収縮とは性質を異にするのであろう。

図23-b に示すように pCrTX を処理したのち洗浄し初期状態に回復後 (120分後) の標本における tyramine の反応は正常標本における反応 (図23-a) に比し著明に

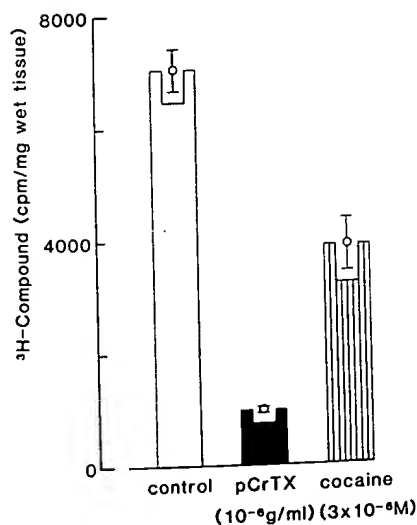


図 24 pCrTX および cocaine による血管平滑筋への ^3H -NE の取り込み阻害

減弱していたが、NE や KCl 誘発の収縮反応には著変がなかった。また、tyramine の他に、nicotine や経壁電気刺激誘発収縮（血管平滑筋壁内在の交感神経終末から NE を遊離することによって収縮を惹起する）の場合にも同様に pCrTX 処理後には著明に減弱ないし消失した。これらのことから、pCrTX の処理により神経終末での NE の取り込み機構およびまたは貯蔵機構が障害を受けていることが推測されたので、pCrTX および比較のために NE 取り込み阻害物質である cocaine を用いて、 ^3H -NE の取り込みに及ぼす影響について検討した（図24）。その結果、cocaine 処置後に ^3H -NE の取り込みは約50%抑制された。これに対して pCrTX 処置後には ^3H -NE の取り込みは約85%抑制された。したがって、pCrTX は神経終末に作用して NE を放出するとともに、NE の取り込み機構およびまたは貯蔵機構に対して障害作用を示すものと考えられた。

前述のように pCrTX 誘発の収縮反応に対して TTX は影響しなかったが、Low-Na 栄養液中では pCrTX 誘発収縮は約40%抑制されたため（表8）、pCrTX 誘発の血管平滑筋の収縮は、組織外 Na^+ 濃度に依存することが示され、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが作動することから、TTX 抵抗性の経路を介した Na^+ の流入がひきかねとなつて膜の脱分極が生じることが推測された。この推測は、 Ca^{2+} free 下で pCrTX を添加しても収縮はおこらないが、その後 Ca^{2+} を添加すると著明な収縮が惹起されるという事実によつても裏付けられる。

また、pCrTX 誘発の収縮反応は、histamine の拮抗剤である chlorphenylamine や cyclooxygenase 阻害剤である indomethacin では影響されないため（表8）、histamine ならびに内因性 prostaglandins の遊離およびこれらの受容体の刺激作用を介するものではないであろう。

以上の結果から、pCrTX は TTX 抵抗性の経路を介した Na^+ の流入をひきかねとして膜の脱分極を来すこと、また、交感神経終末部ならびに平滑筋の両者に作用点を有し、前者に作用する結果、終末部から NE を遊離し、さらに平滑筋に対しては一部電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを刺激して、それぞれ収縮の惹起に関与するものと考えられる。そして両作用はともに、細胞外 Ca^{2+} に依存することが明らかにされた。さらに pCrTX は血管壁内在の交感神経終末部の NE 貯蔵およびまたは取り込み機構に対して障害作用を有することが示唆された。

CrTX-I, II, III 誘発の収縮反応も、細胞外 Ca^{2+} に依存すること、ならびに VPM や phentolamine でそれぞれ約50%抑制されるので、pCrTX 誘発の収縮反応と同様な収縮機構が推測される。したがって、pCrTX の収縮活性発現に際して、CrTX-I, II, III が主要な役割を担うものと思われた。

IV 総括

アンドンクラゲの毒成分について検討し、以下の結論をえた。

1) アンドンクラゲ触手粗抽出液中には、溶血、血小板凝集、肥満細胞脱顆粒、血管平滑筋収縮、皮膚壊死、心臓毒性および致死などの生物活性を示す成分が存在した。溶血活性を指標として毒成分の安定性を検討したところ、pH 4.0 以下、pH 9.0 以上の酸、アルカリ処理、60°C 以上の加熱処理、凍結融解、凍結乾燥、減圧乾固などの操作、および trypsin, chymotrypsin 処理によつて失活するために、溶血活性を示す毒成分の主体は、不安定なタンパク質と考えられた。

2) 粗抽出液を40-60%硫酸分画したのち脱塩し pCrTX を得た。陽イオン交換 HPLC により pCrTX の溶血活性は3峰に溶離し、それぞれをゲル過 HPLC で精製したところ、CrTX-I, II, III の3種の画分がえられた。分子量は、CrTX-I が49000, CrTX-II が100000, 51000, 49000, CrTX-III が51000であつた。いずれも糖を含まず、また、S-S 結合も含まなかった。さらに、CrTX-II は、CrTX-I と CrTX-III の会合体であることが

考えられた。

3) 精製された CrTX-I, II, III は, 粗抽出液中に含まれた全ての生物活性を有し, 粗抽出液および pCrTX からの生物活性の上昇率は, 精製倍率にほぼ一致したため, CrTX-I, II, III が粗抽出液および pCrTX の主成分であると思われた。

4) pCrTX 誘発の血小板凝集は, TTX および procaine 抵抗性の経路を介した細胞外 Na^+ の流入ならびに恐らくは 4-AP, TEA 抵抗性の経路を介した K^+ の流出によって持続的な脱分極が生じ, その結果, 細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の増加を来すために惹起されるものと考えられた。また, 細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の増加には, 一部, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの関与することが示唆された。CrTX-I, II, III 誘発の凝集反応も, pCrTX と同様な機序を介して惹起されることが推察された。

5) pCrTX 誘発の血管平滑筋収縮において, pCrTX は TTX 抵抗性の経路を介した Na^+ の流入をひきかねとして膜の脱分極を来すこと, また, 交感神経末部ならびに平滑筋の両者に作用点を有し, 前者に作用する結果, 終末部から NE を遊離し, さらに平滑筋に対しては一部電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを刺激して, それぞれ収縮の惹起に関与するものと考えられた。そして両作用はともに, 細胞外 Ca^{2+} に依存することが明らかにされた。さらに pCrTX は血管壁内在の交感神経末部の NE 貯蔵もしくは取り込み機構に対して障害作用を有することが示唆された。CrTX-I, II, III 誘発の収縮反応も, pCrTX と同様な収縮機構を介して惹起されることが推測された。

6) アンドンクラゲの毒成分として得られた pCrTX および CrTX-I, II, III の有する溶血, 肥満細胞脱顆粒ならびに心臓毒性発現機序については詳しく検討しなかったが, 恐らくは, これらの毒成分による血小板凝集ならびに血管平滑筋の収縮機序と類似の機序を介して惹起されるものと推測される。また, 致死作用はこれらの作用の総合された結果であろう。詳細については今後の検討を要する。

稿を終るにあたり, 本研究において, 終始, 適切な御助言を頂いた, 生理活性部門, 中嶋暉躬教授, 化学部門, 石川正幸教授, 東洋助教授, 医動物学教室, 加納六郎教授, 多大な協力を頂いた関崎里美氏, 佐久間昇氏, そして生理活性および化学部門の各教室員の皆様に心から感謝の意を表します。

また, アンドンクラゲを同定して頂いた, 国立科学博

物館動物学部門, 今島 実博士, phospholipase A_2 の活性測定でお世話になった東京大学理学部生物化学科, 宮沢辰雄教授, 電子顕微鏡観察をお教えた, 本研究所, 機能性高分子部門, 渡辺昭彦氏, 病理組織検査に協力して頂いた, 昭和電工, 生化学研究所, 佐藤文明氏に, その御厚意に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Cleland, J. B. and Southcott, R. V.: Injuries to man from marine invertebrates in the Australian region. Australian Nat. Health Med. Res. Council. Special Report Series, 12: 282, 1965.
- 2) Ioannides, G. and Davis, J. H.: Portuguese man-of-war stinging. Arch. Derm., 91: 448, 1965.
- 3) 大鶴正満, 関川弘雄, 広飯陽子, 鈴木俊夫, 佐藤良也, 白木 公, 長島義介: 海岸岩場地帯の海水浴客, 潜水者にみられる水中刺咬症. 衛生動物, 24: 225, 1974.
- 4) 山口正士: 立方クラゲ類とその生活史. 海洋と生物, 21: 248, 1982.
- 5) Lane, C. E.: The toxin of *Physalia* nematocysts. Ann. N. Y. Acad. Sci., 90: 742, 1960.
- 6) Freeman, S. E. and Turner, R. J.: A pharmacological study of a cnidarian, *Chironex fleckeri* Southcott. Br. J. Pharmac., 35: 510, 1969.
- 7) Endean, R. and Henderson, L.: Further studies of toxic material from nematocysts of the cubomedusan *Chironex fleckeri* Southcott. Toxicon., 7: 303, 1969.
- 8) Crone, H. D. and Keen, T. E. B.: Chromatographic properties of the hemolysin from the cnidarian *Chironex fleckeri*. Toxicon. 7: 79, 1969.
- 9) Burnett, J. W. and Goldner, R.: Partial purification of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) nematocyst toxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133: 978, 1970.
- 10) Toom, P. M. and Phillips, T. D.: Effects of purified components of jerryfish toxin (*Stomolophus meleagris*) on active sodium transport. Toxicon. 13: 261, 1975.
- 11) Tamkun, M. M. and Hessinger, D. A.: Isolation and partial Characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese man-of-war, *Physalia physalis*. Biochem. Biophys. Acta, 667: 87, 1981.
- 12) Gaur, P. K., Anthony, R. L., Cody, T. S., Calton, G. J. and Burnett, J. W.: Produc-

- tion of a monoclonal antibody against the sea nettle venom mouse lethal factor. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 167 : 374, 1981.
- 13) Cobbs, C. S., Gaur, P. K., Russo, A. J., Warnick, J. E., Calton, G. J. and Burnett, J. W.: Immunosorbent chromatography of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) venom and characterization of toxins. Toxicon., 21 : 385, 1983.
 - 14) 溝口周策, 中野政男: 浜の皮膚. 皮膚臨床, 15 : 447, 1973.
 - 15) 佐藤昭彦, 安原 義, 中嶋暉躬: アンドクラグ刺胞毒の精製と性質. 生化学, 55 : 1019, 1983.
 - 16) 佐藤昭彦, 安原 義, 中嶋暉躬: アンドクラグ毒の精製. 日本薬学会第104年会要旨集, 447, 1984.
 - 17) 佐藤昭彦, 関崎里美, 東 洋, 中嶋暉躬, 石川正幸: アンドクラグによつて惹起される血小板凝集の薬理学的性質. 日本薬理学会関東部会, 39, 1984.
 - 18) 岡田 要: 新日本動物図鑑, 北隆館, 233, 1965.
 - 19) Uchida, T.: Revision of Japanese cubomedusae. Publ. Seto. Mar. Biol. Lab., XVII : 289, 1970.
 - 20) 谷津直秀: アンドクラグの解剖. 動物学雑誌, 351 : 24, 1918.
 - 21) Halstead, B. W.: Poisonous and venomous marine animals of the world. U. S. Government printing office Washington D. C. 1 : 307, 1965.
 - 22) Hummel, B. C. W.: A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Can. J. Biochem. Physiol., 37 : 1393, 1959.
 - 23) Tuppy, H., Wiesbauer, U. and Wintersberger, E.: Aminosäure-p-nitroanilide als Substrate für Aminopeptidasen und andere proteolytische Fermente. Hoppe-Seylers Zeitschrift f. physiol. Chemie, 329 : 278, 1962.
 - 24) Huggins, C. and Lapidus, J.: Chromogenic substrates. IV. Acyl esters of p-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterase. J. Biol. Chem., 170 : 467, 1947.
 - 25) Garen, A. and Levinthal, C.: A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. Biochem. Biophys. Acta, 38 : 470, 1960.
 - 26) Mollay, C., Kreil, G. and Berger, H.: Action of phospholipases on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Stimulation by melitin. Biochem. Biophys. Acta, 426 : 317, 1976.
 - 27) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265, 1951.
 - 28) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227 : 680, 1970.
 - 29) Merrill, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. and Ebert, M. H.: Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science, 211 : 1437, 1981.
 - 30) Eckhardt, A. E., Hayes, C. E. and Goldstein, I. J.: A sensitive Fluorescent method for the detection of glycoproteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 73 : 192, 1976.
 - 31) Tangen, O., Berman, H. J. and Marfey, P.: Gel filtration; A new technique for separation of blood platelets from plasma. Thromb. Diath. Haemorrh., 25 : 268, 1971.
 - 32) Born, G. V. R.: Quantitative investigations into the aggregation of blood platelet. J. Physiol., 162 : 67, 1962.
 - 33) Rink, T. J., Smith, S. W. and Tsien, R. Y.: Cytoplasmic free Ca²⁺ in human platelets: Ca²⁺ thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion. FEBS Letters, 148 : 21, 1982.
 - 34) Tsien, R. Y., Pozzan, T. and Rink, T.: Calcium homeostasis in intact lymphocytes; Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. J. Cell. Biology, 94 : 325, 1982.
 - 35) Friendhoff, L. T. and Sonenberg, M.: The membrane potential of human platelet. Blood, 61 : 180, 1983.
 - 36) Feinberg, H., Michel, H. and Born, G. V. R.: Determination of the fluid volume of platelets by their separation through silicon oil. J. Lab. Clin. Med., 84 : 926, 1974.
 - 37) Feinberg, H., Sandler, W. C., Scorer, M., Le Breton, G. C., Grossman, B. and Born, G. V. R.: Movement of sodium into human platelets induced by ADP. Biochem. Biophys. Acta, 470 : 317, 1977.
 - 38) Godfraind, T. and Dieu, D.: The inhibition by flunarizine of the norepinephrine-evoked contraction and calcium influx in rat aorta and mesenteric arteries. J. Pharm. Exp. Therap. 217 : 510, 1981.
 - 39) Godfraind, T.: Calcium exchange in vascular smooth muscle, action of noradrenaline and lanthanum. J. Physiol., 260 : 21, 1976.
 - 40) Sakakibara, Y., Muramatsu, I., Fujiwara, M.

- and Nagasaka, Y. : Effects of guanabenz on the adrenergic mechanism in rabbit arterial strips. Japan. J. Pharmacol., **31** : 1029, 1981.
- 41) Amellal, M., Binck, M., Frossard, N., Ilien, B. and Land, Y. : Sodium-potassium ATPase inhibition potentiates compound 48/80-induced histamine secretion from mast cells. Br. J. Pharmac., **82** : 423, 1984.
- 42) Yoshida, H., Nakajima, T., Ueno, Y., Koiné, N., Onda, M., Ohe, K. and Miyoshi, A. : Simple and rapid screening method of amino acids and amines in biological samples. Hiroshima J. Med. Sci., **27** : 85, 1978.
- 43) Keen, T. E. B. and Crone, H. D. : Dermatonecrotic properties of extracts from the tentacles of the cnidarian *Chironex fleckeri*. Toxicon., **7** : 173, 1969.
- 44) Herman, A. H. : Ed., Cardiovascular pharmacology of the prostaglandins. Raven press, 1982.
- 45) Hudgings, P. M. and Harris, T. M. : Further studies on the effect of reserpine pretreatment on rabbit aorta ; Calcium and histologic changes. J. Pharmacol. Exp. Ther., **175** : 609, 1970.

=> d his

(FILE 'HOME' ENTERED AT 12:59:32 ON 10 JUN 2002)

INDEX 'ADISALERTS, ADISINSIGHT, ADISNEWS, AGRICOLA, ANABSTR, AQUASCI, BIOBUSINESS, BIOCOMMERCE, BIOSIS, BIOTECHABS, BIOTECHDS, BIOTECHNO, CABA, CANCERLIT, CAPLUS, CEABA-VTB, CEN, CIN, CONFSCI, CROPB, CROPU, DDFB, DDFU, DGENE, DRUGB, DRUGLAUNCH, DRUGMONOG2, ...' ENTERED AT 12:59:39 ON 10 JUN 2002

SEA (JELLY FISH OR PESTICIDE) AND (HEMOLYTIC OR HEMOLYSIS)

6 FILE AGRICOLA
1 FILE AQUASCI
17 FILE BIOBUSINESS
34 FILE BIOSIS
11 FILE BIOTECHABS
11 FILE BIOTECHDS
3 FILE BIOTECHNO
10 FILE CABA
2 FILE CANCERLIT
39 FILE CAPLUS
2 FILE CROPB
4 FILE CROPU
18 FILE DGENE
31 FILE EMBASE
15 FILE ESBIODBASE
1 FILE FSTA
4 FILE HEALSAFE
37 FILE JICST-EPLUS
8 FILE LIFESCI
26 FILE MEDLINE
24 FILE NIOSHTIC
2 FILE NTIS
26 FILE PASCAL
8 FILE PROMT
8 FILE SCISEARCH
76 FILE TOXCENTER
67 FILE USPATFULL
4 FILE WPIDS
4 FILE WPINDEX

L1 QUE (JELLY FISH OR PESTICIDE) AND (HEMOLYTIC OR HEMOLYSIS)

FILE 'TOXCENTER, USPATFULL, CAPLUS, JICST-EPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, PASCAL, NIOSHTIC, BIOBUSINESS, ESBIODBASE, BIOTECHDS, CABA, LIFESCI, PROMT, SCISEARCH, AGRICOLA, CROPU, HEALSAFE, WPIDS, BIOTECHNO, CANCERLIT, CROPB, NTIS, AQUASCI, FSTA, DGENE' ENTERED AT 13:02:17 ON 10 JUN 2002

L2 484 S (JELLY FISH OR PESTICIDE) AND (HEMOLYTIC OR HEMOLYSIS)
L3 317 DUP REM L2 (167 DUPLICATES REMOVED)
L4 25 S JELLY FISH AND (HEMOLYTIC OR HEMOLYSIS)
L5 25 DUP REM L4 (0 DUPLICATES REMOVED)
L6 66 S (HEMOLYTIC (4A) PESTICIDE) OR (HEMOLYSIS (4A) PESTICIDE)
L7 40 DUP REM L6 (26 DUPLICATES REMOVED)
L8 110 S CARYBDEA RASTONII
L9 40 DUP REM L8 (70 DUPLICATES REMOVED)
L10 32 S L8 AND (HEMOLYTIC OR HEMOLYSIS)
E NAGAI/AU
E NAGAI H?/AU
E NAGAI HIROSHI/AU
L11 0 S E3 AND JELLY FISH
L12 8 S E3 AND RASTONII
E NAKAJIMA TERUMI/AU
L13 14 S E3 AND RASTONII